



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 41 607 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 41 607.1
㉑ Anmeldetag: 20. 9. 97
㉒ Offenlegungstag: 25. 3. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 7/08
C 07 K 7/06
C 07 K 14/00
C 07 K 16/18
A 61 K 38/10
A 61 K 38/08
A 61 K 38/16
C 07 H 21/04
C 12 N 15/11
G 01 N 33/577
G 01 N 33/53

DE 197 41 607 A 1

㉗ Anmelder:
PRIONICS AG, Zürich, CH

㉘ Vertreter:
Patentanwälte Schaefer & Emmel, 22043 Hamburg

㉙ Erfinder:
Moser, Markus, Zürich, CH; Oesch, Bruno, Stilli, CH;
Korth, Carsten, San Francisco, Calif., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen
⑤⑦ Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrPSc-bindenden Substanzen erkannt werden.

DE 197 41 607 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf synthetische Polypeptide, die insbesondere bei der Diagnose, Vorbeugen und Behandlung von einer Reihe von übertragbaren, degenerativen neurologischen Erkrankungen Verwendung finden können. Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff spongiforme Enzephalopatie oder auch Prionerkrankungen zusammengefaßt. Sie treten in unterschiedlichen Säugetierspezies auf, z. B. als Scrapie bei Schafen, als BSE bei Kühen und als Kuru oder Creutzfeldt-Jacob-Krankheit bei Menschen.

Als einziges mit dem infektiösen Agens assoziiertes Molekül wurde bislang ein krankheitsspezifisches Prionprotein (PrP^{Sc}) gefunden, das eine abnorme Isoform eines normalen Wirtsproteins (PrP^{C}) unbekannter Funktion ist. Beide Isoformen PrP^{Sc} und PrP^{C} stimmen bezüglich Molekulargewicht und Aminosäuresequenz überein. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Faltung und ihren Eigenschaften. Während z. B. PrP^{C} überwiegend α -helicale Sekundärstrukturen besitzt, löslich und proteaseverdaulich ist, weist PrP^{Sc} vor allem β -Faltblattstrukturen auf, ist unlöslich und kann von Proteasen nur teilweise abgebaut werden. Viele Indizien, insbesondere die Abwesenheit von anderen Molekülen außer PrP^{Sc} im Prion, und vor allem die Abwesenheit von Nukleinsäuren, deuten darauf hin, daß PrP^{Sc} eine (wenn nicht die) zentrale Rolle bei der Auslösung der oben genannten Krankheiten zukommt. Es wird angenommen, daß PrP^{Sc} -Proteine in der Lage sind, normale PrP^{C} -Proteine in die krankheitsspezifische Faltung zu konvertieren, was die Infektiosität von PrP^{Sc} -Proteinen erklären würde.

Es scheint daher vielversprechend ausgehend von PrP^{Sc} als zentralen Krankheitsmolekül Therapie- oder Diagnosemöglichkeiten zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist in diesem Zusammenhang, synthetische Polypeptide bereitzustellen, die immunogene Eigenschaften oder generell Bindungseigenschaften des PrP^{Sc} nicht jedoch dessen Infektiosität aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe mit synthetischen Polypeptiden entsprechend des Anspruchs 1.

Es handelt sich dabei um Polypeptide, die eine oder mehrere definierte Sequenzen des PrP (PrP bezeichnet das Prionprotein im allgemeinen unabhängig von seiner Konfiguration) enthalten, wobei diese Sequenzen von PrP^{Sc} -bindenden Substanzen in z. B. den weiter unten beschriebenen Mapping-Experimenten erkannt werden. Es gibt eine ganze Reihe von unterschiedlichen PrP^{Sc} -spezifisch bindenden Substanzen. Beispiele hierfür sind weiter unten angegeben.

Zusammengefaßt enthalten die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide dann mindestens eine Sequenz, die im nativen PrP^{Sc} an dessen Oberfläche angeordnet ist und dort alleine oder in Verbindung mit weiteren der im Rahmen der Erfindung einsetzbaren Sequenzen eine Bindungsstelle bilden. An der Ausbildung dieser PrP^{Sc} -spezifischen Oberflächenstrukturen ist mindestens eine der beiden im Strukturmodell des rekombinanten PrP vorhandenen β -Faltblattstrukturen, oder beide, beteiligt. Es wird angenommen, daß diese Strukturen im PrP^{Sc} als Nukleationspunkt bei der Ausbildung der Oberfläche einen dominierenden Einfluß haben.

Künstliche Polypeptide, die im nativen PrP^{Sc} vorhandene Bindungsstelle simulieren, können sowohl zur Therapie oder Diagnose als auch zur Vorbeugung und sonstigen Anwendungszwecken von Interesse sein.

Unter die Erfindung fallen insbesondere synthetische Polypeptide, die einen oder mehrere der im Anspruch 2 genannten folgenden Sequenzbereiche aufweisen:

- a) Gly-R₁-Asp-R₂-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)
- c) Cys-R₇-Thr-Gln-Tyr-R₈-R₉-Glu-Ser-R₁₀-Ala-(R₁₁Tyr)
- d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R₁₂-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R₁ = Asn oder Ser, R₂ = Trp oder Tyr, R₃ = Arg oder Lys, R₄ = Met, Val oder Ala, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn, R₇ = Val, Thr oder Ile, R₈ = Gln oder Glu, R₉ = Lys, Arg oder Gln, R₁₀ = Gln oder Glu, R₁₁ und Tyr, Ser oder Ala und R₁₂ = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

Weitere synthetische Polypeptide im Rahmen der Erfindung können nach Anspruch 3 eine oder mehrere der folgenden Sequenzen enthalten:

- e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- f) Lys-Pro-R₁₄-Lys-Pro-Lys-Thr-R₁₄-R₁₅-Lys-His-R₁₆-Ala-Gly
- g) Tyr-R₁₆-Leu-Gly-Ser
- h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R₁₇-R₁₇-His-Phe-Gly-R₁₄-Asp
- i) Asn-Met-R₁₈-Arg-Tyr-(Pro-R₁₄)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R₁₉)

in denen R₁₄ = Asn oder Ser, R₁₅ = Met, Leu oder Phe, R₁₆ = Met oder Val, R₁₇ = Ile, Leu oder Met, R₁₈ = His, Tyr oder Asn und R₁₉ = Lys oder Arg ist und die in Klammern gesetzten Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

Die Sequenzen gemäß Anspruch 2 und 3 wurden in sogenannten "Mapping-Experimenten" auf einer immobilisierten Peptidbank gefunden. Auf der benutzten Peptidbank (erhältlich von Jerini Biotech, Berlin) sind 104 Peptide mit jeweils 13 Aminosäuren mit ihrem C-terminalen Ende auf einer Cellulosemembran befestigt. Sie decken die gesamte Sequenz des PrP (PrP bezeichnet im folgenden generell die dem Prionprotein zugrundeliegende Aminosäuresequenz unabhängig von der Konformation) ab und sind so angeordnet, daß sie um jeweils zwei Aminosäuren verschoben sind, d. h. jeweils 11 Aminosäuren zwischen zwei benachbarten Peptiden überlappen. In mehreren Mapping-Experimenten wurden Peptidbanken mit unterschiedlichen PrP^{Sc} bindenden Substanzen beaufschlagt und die Bindung dieser Substanzen an spezielle Sequenzbereiche unter Verwendung z. B. eines Chemolumineszenz-Kits (ECL, Amersham, USA) sichtbar gemacht.

Zur Ermittlung der Sequenzen gemäß Anspruch 2 wurden in "Mapping-Experimenten" als PrP^{Sc} -bindende Substanzen ein PrP^{Sc} -spezifischen Antikörper mit der Bezeichnung 15B3 und (wie in eigenen Vorversuchen gezeigt wurde ebenfalls

PrP^{Sc}-spezifisches) rekombinantes bovines-PrP (rbPrP) mit der in Fig. 4 angegebenen Sequenz eingesetzt. Zur Herstellung von rbPrP kann z. B. eine Zelllinie (z. B. E. coli) mit einem Vektor, der rbPrP exprimiert, in einem geeigneten Medium (z. B. Luria-Broth) angezogen und dann aus den Inklusionskörpern der Zellen nach Lysis und weiteren konventionellen Reinigungsmethoden das Prion-Protein isoliert werden (siehe auch Hornemann et al., FEBS-Letters (97) 413 (2; 277-28)).

Bei 15B3 handelt es sich um einen unlängst von den Erfindern entdeckten monoklonalen PrP^{Sc}-Antikörper. Hybridomazellen, die die genannten (PrP^{Sc}-spezifischen) Antikörper 15B3 produzieren, wurden am 13. Februar 1997 unter der Nummer DSM ACC2298 bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig hinterlegt.

In beiden Fällen erkannten die beiden unterschiedlichen bindenden Substanzen, der Antikörper 15B3 und das rekombinante rbPrP übereinstimmend die Sequenzen a-d gemäß Anspruch 1, wie für 15B3 in Fig. 1 und für rbPrP in Fig. 2 wiedergegeben.

Die in Fig. 1 und 2 angegebenen Nummern bezeichnen die unterschiedlichen Peptidsequenzen der Bank, an denen der monoklonale Antikörper 15B3 bzw. rbPrP bindet. Die erfindungsgemäßen Sequenzen entsprechend dabei jeweils den den jeweiligen räumlich benachbarten Bindungspeptiden gemeinsamen Bereichen. Fig. 2 gibt dabei wie bereits erwähnt das Ergebnis eines Mappingexperimentes wieder, dessen Bedingungen dem in Fig. 1 dargestellten Experiment entsprechen. Hier wurde lediglich der Antikörper 15B3 gegen rekombinantes bovines rbPrP ausgetauscht. Die Bindungsstellen des rekombinanten rbPrP sind auf der aus technischen Gründen nicht besser wiederzugebende Darstellung mit Markierungen hervorgehoben. Es handelt sich um mit Fig. 1 übereinstimmende Bindungsstellen.

Die in Anspruch 3 angegebenen Sequenzen wurden ebenfalls mittels Mappingexperimenten ermittelt. Allerdings wurde hier als erkennende Substanz nicht ein Antikörper oder rbPrP, sondern der Farbstoff Kongorot eingesetzt, dessen spezifische Bindung für PrP^{Sc} bereits seit längerem bekannt ist (Prusiner et al., Cell 35, 349-358; 1983). Fig. 3 zeigt die entsprechende Peptidbank mit den angefärbten Bindungsbereichen, aus denen wie oben angegeben die Sequenzen e-i ermittelt wurden.

In den Fig. 1-3 erkennt man, daß es sich bei den Sequenzen a-d bzw. e-i um nicht linear zusammenhängende Sequenzen aus PrP handelt. An einem 3-dimensionalen Modell eines C-terminalen Fragments von rekombinantem Maus-PrP konnte gezeigt werden, daß sich hier zwei der im Anspruch 2 angegebenen Sequenzen a-d in räumlicher Nähe zueinander befinden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist davon auszugehen, daß bei der Konformationsänderung auch die beiden anderen Sequenzen eine andere Position einnehmen, dergestalt daß im PrP_{Sc} wohl alle vier Sequenzen a-d benachbart angeordnet sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein konformationelles Epitop ausbilden.

Die beanspruchten Sequenzen stellen damit Sequenzbereiche dar, die in einer Peptidbank einzeln von z. B. einem PrP^{Sc}-spezifischen Antikörper erkannt werden und die darüber hinaus mit hoher Wahrscheinlichkeit im nativen PrP^{Sc}-Protein einzeln oder zu mehreren einen oberflächlichen Bindungsbereich z. B. ein Epitop ausbilden. Unter Epitop wird der spezifische Ort auf der Oberfläche des PrP^{Sc}-Proteins verstanden, der z. B. durch das Idiotyp von 15B3 gebunden werden kann.

Erfindungsgemäß werden damit synthetische Polypeptide bereitgestellt, die im Mindestfall eine der von den genannten PrP^{Sc}-bindenden Substanzen in der Peptidbank erkannten Sequenzen (sowie möglicherweise zusätzliche) enthalten.

Künstliche Polypeptide, die einen antigenen Bereich von PrP^{Sc} aufweisen, sind bereits in der WO 93/11153 angegeben worden. Die dort genannten Sequenzen stellen relativ umfangreich Ausschnitte aus der PrP-Sequenz dar. Die genaue Abgrenzung einer Sequenz, die z. B. ein Epitop ausbildet oder daran beteiligt ist, fehlt, was insbesondere den räumlichen Nachbau von minimalen synthetischen Polypeptiden mit z. B. der immunogenen Wirkung von PrP^{Sc} erschwert bzw. unmöglich macht.

Wie oben ausgeführt, können die synthetischen Polypeptide im Minimalfall lediglich aus einer der z. B. im Anspruch 2 oder genannten Sequenzen bestehen. Es ist aber auch möglich, sie mit geeigneten weiteren Sequenzen, die im Folgenden Konformationssequenzen genannt werden, zu verbinden.

Theoretisch wäre es z. B. möglich, die z. B. die Sequenzen ggf. über diese Konformationssequenzen und eventuelle weitere Sequenzen dergestalt untereinander zu verbinden, daß die vermutete räumliche Anordnung im PrP^{Sc}-Protein simuliert wird. Im Idealfall würde man auf diese Weise ein Protein mit einer Oberfläche (Epitop) erhalten, in dem wie im PrP^{Sc} mehrere räumlich benachbarte Bindungsstellen enthalten sind.

Erfindungsgemäß ist in einer Ausgestaltung zunächst jedoch vorgesehen, lediglich eine der beanspruchten Sequenz (Sequenz b) dergestalt mit einer Konformationssequenz zu verknüpfen, daß ein synthetisches Polypeptid mit ausreichender immunogener Bindungswirkung z. B. für 15B3 entsteht, wie Untersuchungen der Erfinder zeigten. Ein Polypeptid in dieser Ausgestaltung kann eine der beiden folgenden Sequenzen aufweisen:

- j) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-Z-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-(Y)
 k) (X)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z. B. Gly-Gly ist, R₃ = Arg oder Lys, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn und R₁₃ = Met oder Val ist und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

Die Sequenz j enthält in ihrem C-terminalen Bereich die Sequenz b, die über z. B. den Spacer Gly-Gly mit der sich N-terminal anschließenden Konformationssequenz verbunden ist. In der Sequenz k ist die Abfolge genau umgekehrt. Weitere geeignete Spacer sind generell alle solche Sequenzen, die ausreichende Flexibilität zwischen den verbundenen Peptidbereichen gewährleisten und keinen Einfluß auf die Konformation haben.

Beide bevorzugt eingesetzten synthetischen Polypeptide wurden ausgehend von der Feststellung konzipiert, daß in PrP^{Sc} verstärkt β -Faltblatt-Strukturen auftreten, wobei in aller Regel sequenzauf- oder abwärts eine Konformationssequenz vorliegt, die eine β -Faltblatt-Struktur induziert. Die synthetischen Polypeptide gemäß Anspruch 6 wurden daher mit geeigneten Konformationssequenzen ausgestattet, um die Epitopsequenz in einer für PrP^{Sc}-spezifischen β -Faltblatt-

Struktur anzuordnen.

Wie allgemein bekannt, können Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Größe und ihrer Polarität bzw. Ladung unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Man nennt die in eine Gruppe fallenden Aminosäuren untereinander homolog und unterscheidet folgende 5 Gruppen:

- 1.) Kleine aliphatische nicht polare oder nur geringfügig polare Säuren: Alanin, Serin, Threonin und in Grenzen Glycin, Prolin
- 2.) Polare, negativ geladene Säuren und ihre Amide Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure und Glutamin
- 3.) Polare, positiv geladene Säuren: Histidin, Arginin, Lysin
- 4.) Große aliphatische, nicht polare Säuren: Methionin, Leucin, Isoleucin, Valin, Cystein
- 6.) Große aromatische Säuren: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

In vielen Fällen können in Peptidsequenzen enthaltene Aminosäuren durch entsprechende Säuren aus derselben Gruppe ersetzt werden, ohne daß die Eigenschaften der Sequenz dadurch eine Änderung erfahren. Unter die Erfindung fallen daher auch solche Sequenzen, die nicht den explizit genannten Formeln entsprechen, sondern in denen ein Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren gegen eine homologe Säure vorgenommen wurde.

Weiterhin kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß Aminosäuresequenzen unabhängig von ihrer Bildungseinrichtung unter bestimmten Umständen ähnliche Bindungseigenschaften, insbesondere Antikörperbindungseigenschaften haben können. Man spricht in diesem Fall von retro-Aminosäuresequenzen und bezeichnet damit übereinstimmende Sequenzen, die in C- oder N-terminaler Richtung gebildet sind (z. B. [N-terminal]-Glu-Ala-Val-Leu-[C-terminal], [N-terminal]-Leu-Val-Ala-Glu-[C-terminal]). Falls die verwendeten Aminosäuren statt der in Tieren vorkommenden L-Form in der chiralen D-Gegenform vorliegen, so werden die Epitopbereiche spiegelbildlich ausgebildet und ebenfalls von einigen Antikörpern erkannt, wobei sich die Isotypen der Antikörper in diesen Eigenschaften unterscheiden. Man spricht in diesem Fall von inverso-Aminosäuresequenzen. Falls sowohl inverso als auch retro-Aminosäuren verwendet werden, ergeben sich z. B. übereinstimmende Epitopbereiche, die uneingeschränkt von dem zur ursprünglichen Sequenz spezifischen Antikörper gebunden werden. Der Vorteil der Verwendung von z. B. retro-inverso-Aminosäuresequenzen besteht darin, daß D-Aminosäuren vom Organismus langsamer abgebaut werden, da sie von den abbauenden Enzymen schlechter erkannt werden. Der gleiche Effekt kann auch durch die Substitution von nicht natürlichen Aminosäuren erzielt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide können daher auch in retro- und/oder inverso Form vorliegen oder weiterhin auch nicht natürliche (also nicht von Organismus produzierte) Aminosäuren enthalten. Nichtnatürliche Aminosäuren lassen sich durch Synthetisierung von z.B. zusätzlichen Seitenketten oder reaktiven Gruppen gezielt mit speziellen Eigenschaften und an bestimmte Anwendungszwecke angepaßt herstellen.

Wie oben ausgeführt, können die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide insbesondere bei der Behandlung, Vorbeugung oder auch Diagnose von Prionerkrankungen eingesetzt werden.

Es ist insbesondere daran gedacht, die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide als Impfstoff darzustellen. Dazu wird z. B. eine ausreichende Menge Peptid mit Freund's komplettem Adjuvans aufgelöst und subkutan oder intramuskulär injiziert. In mehrwöchigen Abständen wird wiederum eine immunogene Menge Peptid in Freund's inkomplettem Adjuvans aufgelöst und injiziert (Boost). Ziel der Impfung ist, eine Immunantwort zu provozieren, die die endogene Produktion von Antikörpern beinhaltet, die spezifisch PrP^{Sc} erkennen und neutralisieren bzw. kennzeichnen können, so daß körpereigene Abwehrmechanismen einer Erkrankung vorbeugen bzw. den Krankheitsprozeß verlangsamen bzw. stoppen können.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die synthetischen Polypeptide in der Diagnose und Therapie einzusetzen. Nach der herrschenden Konversionstheorie wird davon ausgegangen, daß PrP^{Sc} und/oder PrP^C auch untereinander binden. Gestützt wird diese Annahme durch weitere Mappingversuche der Erfinder, in denen gezeigt wurde, daß (wie aus Fig. 2 zu entnehmen) rekombinantes bovines rbPrP an ähnlichen Sequenzbereichen bindet wie der oben genannte Antikörper 15B3.

Die erwähnten Bindungseigenschaften kann man sich z. B. bei der Therapie zunutze machen. Denkbar wäre, die erfindungsgemäßen Polypeptide in den Körper eines erkrankten Patienten hirn-gängig zu applizieren und dort dem infektiösen PrP^{Sc} als Bindungspartner zur Verfügung zu stellen. Auf diese Weise könnte man die Konversionsrate möglicherweise drastisch senken und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen. Zu Diagnosezwecken wäre es denkbar, in Probematerial eventuell erhaltenes PrP^{Sc} mittels der erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch zu binden und dann auf geeignete Weise nachzuweisen.

Die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide sind nicht auf die angegebenen Sequenzen beschränkt. Denkbar sind auch Peptide, die in derivatisierter Form vorliegen. Interessant könnte es z. B. sein, solche Peptide mit einem Carrier bzw. Immunogen, wie z. B. Diphteriatoxid oder BSA zur Verstärkung der Immunantwort zu verbinden. Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung wäre die Verknüpfung mit Markern, wie z. B. Biotin oder Peroxidase bzw. mit Enzymen oder Nukleinsäuren. Denkbar wäre schließlich auch, Signalsequenzen vorzusehen, die die Durchgängigkeit der Peptide in gewünschte Kompartimente erleichtern. Gedacht ist dabei insbesondere an die Blut-Hirn-Schranke, deren Passage durch Verwendung von Signalsequenzen, die z. B. an Transferrinrezeptor binden, erleichtert werden können.

Wie oben mehrfach angesprochen, sollen die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide bei der Therapie, Diagnose und Prophylaxe von Prionerkrankungen Verwendung finden. In Verbindung mit allen genannten Anwendungszwecken ist ein wesentliches Element, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide einzeln oder in Verbindung mit weiteren Substanzen einem Patienten verabreicht werden, wobei, wie oben ausgeführt, derivatisierte Formen eingesetzt werden können, um die Gängigkeit in bestimmte Kompartimente zu erhöhen.

Die Herstellung der Polypeptide kann auf beliebige Weise erfolgen. Entweder direkt über übliche Peptidsynthesetechniken oder aber auch indirekt über RNA- oder DNA-Synthese und dann mittels konventioneller molekularbiologischer Techniken. Dementsprechend richtet sich ein weiterer Aspekt der Erfindung auf ein DNA-Molekül, das in der Lage ist, eins der erfindungsgemäßen Polypeptide zu kodieren. Vorzugsweise wird ein solches DNA-Molekül (ggf. auch in ei-

ner längeren Sequenz) in einem geeigneten Expressionsvektor zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Routinetechniken.

Die Erfindung richtet sich weiterhin auch auf einen Kit zur Diagnose von PrP^{Sc} bzw. von Antikörpern gegen PrP^{Sc}, der mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide enthält. Man macht sich hierbei die Tatsache zunutze, daß die Polypeptide spezifisch am PrP^{Sc} und an den dagegen gerichteten Antikörpern zu binden vermögen.

Wie oben bereits angesprochen kann eine der zu Ermittlung der Polypeptidsequenzen eingesetzten bindenden Substanzen rekombinantes bovines rbPrP sein. Es hat sich überraschend herausgestellt, daß rekombinantes rbPrP in der Lage ist, spezifisch an PrP^{Sc} zu binden und an der entsprechenden Peptidbank die selben Sequenzen zu erkennen, wie der Antikörper 15B3 (siehe Fig. 2).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft daher die Verwendung von rekombinantem rbPrP-Protein entsprechend der Sequenz in Fig. 4. Es hat sich herausgestellt, daß bei Verabreichung von rekombinantem rbPrP mit der angegebenen Sequenz PrP^{Sc}-spezifische Antikörper produziert werden. Diesen Effekt kann man sich insbesondere im Rahmen der Prophylaxe oder Therapie zunutze machen, indem man einem Patienten rekombinantes rbPrP als Impfstoff aufbereitet verabreicht und eine entsprechende Immunantwort auslöst.

Die Ausgestaltung ist selbstverständlich nicht auf die Verwendung von bovinem rbPrP gemäß Fig. 4 beschränkt. Genauso gut können rekombinante PrP-Sequenzen mit artspezifischen Abweichungen von der in Fig. 4 gezeigten rbPrP-Sequenz verwendet werden.

Schließlich betrifft die Erfindung auch noch ein Verfahren zur Herstellung von PrP^{Sc}-spezifischen Antikörpern. Zur Immunisierung wird nicht menschlichen Säugetieren mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis verabreicht und der dagegen gebildete Antikörper mit üblichen Methoden isoliert.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich schließlich auch zur Verwendung in sogenannten pharmazeutischen oder chemischen Libraries, mit denen neue Wirkstoffe getestet bzw. ermittelt werden, die spezifisch an PrP^{Sc} binden.

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prionics AG
- (B) STRASSE: Winterthurerstr. 190
- (C) ORT: Zuerich
- (D) BUNDESLAND: Zuerich
- (E) LAND: Schweiz
- (F) POSTLEITZAHL: CH-8057

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:
ANMELDENUMMER: DE 19741607.1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 219 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bos taurus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Arg	Tyr	Pro	Gly	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Asn	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gln		
		20						25					30				
Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro		5
		35					40					45					
His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro		
	50					55					60						
His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln		10
	65				70					75					80		
Gly	Gly	Thr	His	Gly	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn		
				85					90					95			
Met	Lys	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Gly		15
			100					105					110				
Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Leu	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Arg	Pro	Leu	Ile	His		
		115					120					125					20
Phe	Gly	Ser	Asp	Tyr	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Met	His	Arg		
	130					135					140						
Tyr	Pro	Asn	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Gln	Tyr	Ser	Asn	Gln		25
	145				150					155					160		
Asn	Asn	Phe	Val	His	Asp	Cys	Val	Asn	Ile	Thr	Val	Lys	Glu	His	Thr		
				165					170					175			
Val	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn	Phe	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	Lys		30
			180					185					190				
Met	Met	Glu	Arg	Val	Val	Glu	Gln	Met	Cys	Ile	Thr	Gln	Tyr	Gln	Arg		
		195					200					205					
Glu	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Gly	Ala	Ser							35
	210					215											

Patentansprüche

1. Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrP^{Sc}-bindenden Substanzen erkannt werden.

2. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mindestens eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:

- Gly-R₁-Asp-R₂-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)
- Cys-R₇-Thr-Gln-Tyr-R₈-Glu-Ser-R₁₀-Ala-(R₁₁Tyr)
- (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R₁₂-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R₁ = Asn oder Ser, R₂ = Trp oder Tyr, R₃ = Arg oder Lys, R₄ = Met, Val oder Ala, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn, R₇ = Val, Thr oder Ile, R₈ = Gln oder Glu, R₉ = Lys, Arg oder Glu, R₁₀ = Gln oder Glu, R₁₁ = Tyr, Ser oder Ala und R₁₂ = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

3. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mindestens eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:

- Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- Lys-Pro-R₁₄-Lys-Pro-Lys-Thr-R₁₄-R₁₅-Lys-His-R₁₆-Ala-Gly
- Tyr-R₁₆-Leu-Gly-Ser
- Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R₁₇-R₁₇-His-Phe-Gly-R₁₄-Asp
- Asn-Met-R₁₈-Arg-Tyr-(Pro-R₁₄)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R₁₉)

in denen R₁₄ = Asn oder Ser, R₁₅ = Met, Leu oder Phe, R₁₆ = Met, oder Val, R₁₇ = Ile, Leu oder Met, R₁₈ = His, Tyr oder Asn und R₁₉ = Lys oder Arg ist, und die in Klammern angegebenen Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

4. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz gegebenenfalls über eine übliche Spacersequenz mit einer "Konformations"-sequenz gekoppelt ist, die die Ausbildung einer definierten Konformation des synthetischen Polypeptids induziert.

5. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die "Konformations"-sequenz die Ausbildung eines β -Strands induziert.

6. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 2, 4 und 5 entsprechend einer der folgenden Formeln:

e) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-Z-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-(Y)

f) (X)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z. B. Gly-Gly ist, R₃ = Arg oder Lys, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn und R₁₃ = Met oder Val ist, und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

7. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in mindestens einer Teilsequenz in retro-Form vorliegt.

8. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der enthaltenen Aminosäuren in der D-Form vorliegt.

9. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in derivatisierter Form vorliegt.

10. Pharmazeutische Zubereitung zur Therapie von Prionerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eines der in den Ansprüchen 1-9 genannten synthetischen Polypeptide oder mindestens eine die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-bindende Substanz in einer zur Therapie oder Vorbeugung ausreichenden Dosis enthält.

11. Mittel zur Diagnose von Prionerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eines der in den Ansprüchen 1-9 genannten synthetischen Polypeptide oder mindestens eine die definierte Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-bindende Substanz in einer für den jeweiligen Nachweis ausreichenden Dosis enthält.

12. Impfstoff zur Vorbeugung und Therapie von Prionerkrankungen mit mindestens einem der Polypeptide gemäß den Ansprüchen 1-9 oder mindestens einer die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-spezifischen Substanz in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis.

13. Pharmazeutische Zubereitung zur Diagnose oder Impfstoff nach einem der Ansprüche 9-12, dadurch gekennzeichnet, daß die enthaltene PrP^{Sc}-bindende Substanz rekombinant erzeugtes rbPrp mit der in Fig. 4 wiedergegebenen Formel bzw. artspezifischer Abweichungen davon ist.

14. DNA-Molekül, das mindestens für eines der synthetischen Polypeptide nach den Ansprüchen 1 bis 9 kodiert.

15. Kit zur Detektion PrP^{Sc} bzw. von Antikörpern dagegen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens ein synthetisches Polypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 9 enthält.

16. Verfahren zur Herstellung von PrP^{Sc} spezifischen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-menschliche Säugetiere mit mind. einem Polypeptid gemäß der Ansprüche 1-9 immunisiert werden und der bzw. die dagegen gebildete(n) Antikörper nach einer zur Immunisierung ausreichenden Zeitperiode auf üblichem Wege aus dem Säugetier isoliert werden.

17. Verfahren zur Detektion von PrP^{Sc} spezifischen Oberflächensequenzbereichen, dadurch gekennzeichnet, daß eine PrP-spezifischer Peptidbank mit PrP^{Sc}-bindenden Substanzen inkubiert und mittels gängiger Visualisationstechniken die bindenden Bereiche der Peptidbank sichtbar gemacht und daraus die Sequenzbereiche ermittelt werden.

18. Verwendung der Polypeptide nach den Ansprüchen 1-9 in einer pharmazeutischen oder chemischen Library zur Detektion von PrP^{Sc}-spezifischen Wirkstoffen.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

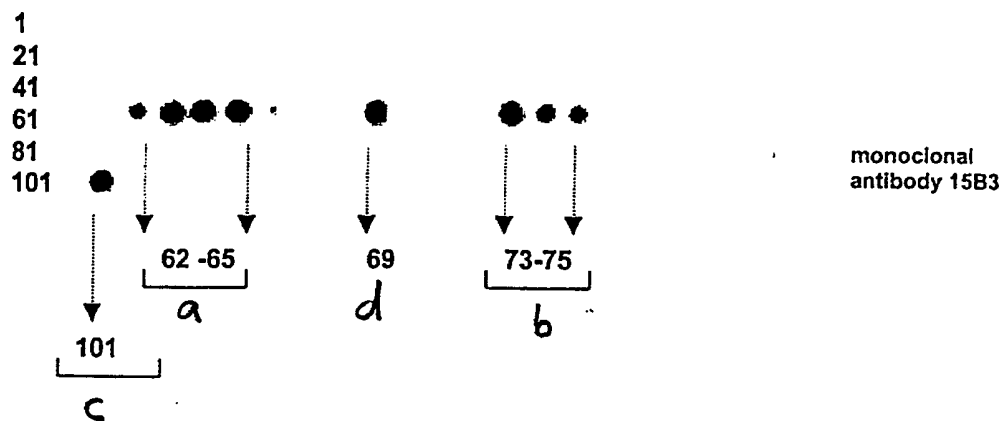


Fig 1

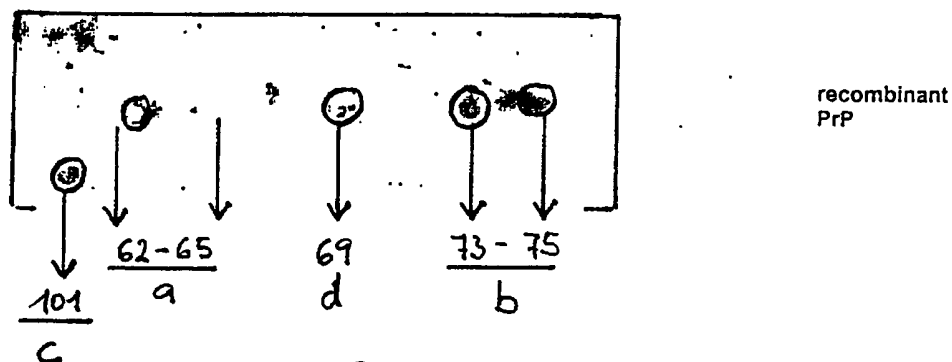


Fig 2

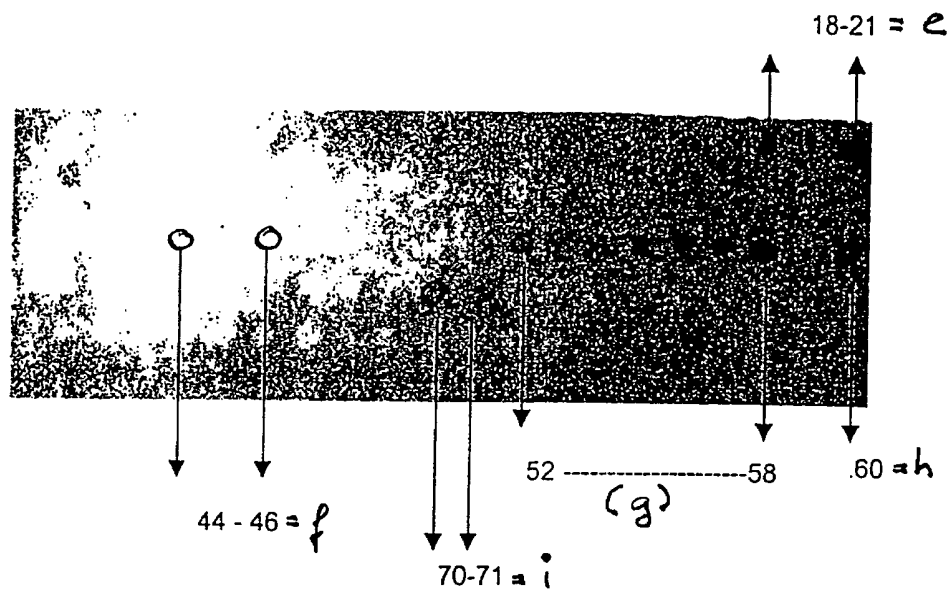


Fig 3

Met Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 35 40 45
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 50 55 60
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 65 70 75 80
 Gly Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 85 90 95
 Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly
 100 105 110
 Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His
 115 120 125
 Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg
 130 135 140
 Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Glu His Thr
 165 170 175
 Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys
 180 185 190
 Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg
 195 200 205
 Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser
 210 215

Fig 4

Synthetic polypeptides for the diagnosis and treatment of Prion diseases.

The present invention concerns synthetic polypeptides, which are useful in applications such as the diagnosis, prevention and treatment of a series of contagious, degenerative neurological diseases. These diseases fall under the description spongiform encephalopathy or Prion diseases. They occur in different species of mammals, for example in the form of Scrapie in sheep, BSE in cows and Kuru or Jakob-Creutzfeldt disease in humans.

Until now, the only molecule found which is associated with the infection-releasing agent is a disease-specific Prion protein (PrP^{Sc}), which is an abnormal isoform of a normal host protein (PrP^C), with an unknown function. Both PrP^C and PrP^{Sc} isoforms are similar with regard to molecular weight and amino acid sequence.

They differ in their spatial convolution and in their characteristics. For example, while PrPC has mostly α -helical secondary structures, is soluble and is protease digestible, PrPSc has mostly β -pleated sheets, is insoluble and is only partially decomposed by proteases. Many indications, such as the absence of molecules other than PrPSc in the Prion and in particular the absence of nucleic acids suggest that PrPSc plays a (if not the) central role in the release of the above mentioned diseases. It is assumed that PrPSc proteins are able to convert normal PrPC proteins in the disease specific convolution, which would explain the infectiousness of PrPSc proteins.

It appears promising to develop therapeutic or diagnostic possibilities using PrPSc as the central disease molecule.

The object of the invention, in this connection, is to make available polypeptides, which have the immunogenic characteristics or general binding characteristics of the PrPSc but which are not infectious.

The problem is solved with synthetic polypeptides in accordance with patent claim 1.

The polypeptides here will contain one or several defined sequences of the PrP (PrP describes the Prion protein in general regardless of its conformation), whereby these sequences of PrPSc binding substances in, for example, the mapping experiments described below, are recognizable. A number of different PrPSc specific binding substances exist. Examples thereof are listed below.

In summary, the synthetic polypeptides, according to the invention, contain at least one sequence, which is located in the native PrPSc on its surface where it will form a binding site alone or in connection with other sequences which can be inserted in the framework of the invention. At the training of these PrPSc specific surface structures at least one of the two β -pleated sheets present in the structure model of the recombinant PrP or both are occupied. It is assumed that these structures have a dominating influence on the training of the surface in the PrPSc as the nucleation point.

Synthetic polypeptides which simulate the binding sites present in native PrPSc are of interest for the treatment or diagnosis as well as for the prevention and other purposes.

The invention includes in particular synthetic polypeptides which have one or several of the sequence areas mentioned in patent claim 2 and below:

- a) Gly-R1-Asp-R2-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R3-Pro-R4-Asp-R5-Tyr-R6-(Asn-Gln)
- c) Cys-R7-Thr-Gln-Tyr-R8-R9-Glu-Ser-R10-Ala-(R11-Tyr)
- d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R12-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in which R1 = Asn or Ser, R2 = Trp or Tyr, R3 = Arg or Lys, R4 = Met, Val or Ala, R5 = Gln, Glu or Arg, R6 = Ser or Asn, R7 = Val, Thr or Ile, R8 = Gln or Glu, R9 = Lys, Arg or Gln, R10 = Gln or Glu, R11 = Tyr, Ser or Ala and R12 = His, Tyr or Asn and the amino acids listed in parenthesis are not necessarily present.

Other synthetic polypeptides in the framework of the invention could contain one or several of the sequences mentioned in patent claim 3 and below:

- e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- f) Lys-Pro-R14-Lys-Pro-Lys-Thr-R14-R15-Lys-His-R16-Ala-Gly
- g) Tyr-R16-Leu-Gly-Ser
- h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R17-R17-His-Phe-Gly-R14-Asp
- i) Asn-Met-R18-Arg-Tyr-(Pro-R14)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R19)

in which R14 = Asn or Ser, R15 = Met, Leu or Phe, R16 = Met or Val, R17 = Ile, Leu or Met, R18 = His, Tyr or Asn and R19 = Lys or Arg and the amino acids or sequence areas listed in parenthesis are not necessarily present.

The sequences according to patent claims 2 and 3 were found in so-called "mapping experiments" on an immobilized peptide bank. On the used peptide bank (available from Jerini Biotools, Berlin), 104 peptides are fastened to a cellulose membrane with 13 amino acids each with their c-terminals end. They cover the entire sequence PrP (PrP will in the following generally describe the amino acid sequence that the Prion protein is based on independently of the conformation) and is arranged in such a manner that they have been staggered by two amino acids, in other words, 11 amino acids between two neighboring peptides, overlap. In several mapping experiments peptide banks were charged with different PrPSc binding substances and the binding of these substances have become visible on special sequence areas using for example a chemoluminescence kit (ECL, Amersham, USA).

For the assessment of the sequences in accordance with patent claim 2, mapping experiments were used in which a PrPSc specific antibody called

15B3 and (and as shown in some previous experiments also PrPSc specific) recombinant bovine PrP (rbPrP) with the sequence in figure 4, were used as a PrPSc binding substance. For the production of rbPrP, a cell line (for example E.coli) with a vector which expresses rbPrP in a suitable medium (for example Luria-Broth) could be taken and the Prion protein could then be isolated from the inclusion bodies of the cells using Lysis and other conventional cleaning methods (please also see Hornemann et al., FEBS-Letters (97) 413 (2: 277-281).

15B3 is an already known monoclonal PrPSc antibody. Hybridoma cells which produce the mentioned (PrPSc specific) 15B3 antibodies were deposited on February 13, 1997 under index number ACC2298 in *deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* [The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Limited] in Braunschweig.

In both cases the differently binding substances recognized the 15B3 antibodies and the recombinant rbPrP in compliance with the sequences a-d according to patent claim 1 as is shown for 15B3 in figure 1 and for rbPrP in figure 2.

The numbers shown in figures 1 and 2 describe the different peptide sequences of the bank onto which the monoclonal antibodies 15B3 or, as the case may be, rbPrP bind. The sequences in accordance with the invention correspond to each of the common areas of each of the neighboring binding peptides. Figure 2, as has already been mentioned, shows the mapping experiments whose conditions correspond to the experiment shown in figure 1. Here the antibody 15B3 was exchanged for recombinant bovine rbPrP. The binding locations of the recombinant rbPrP have been marked in bold, technical reasons making any better marking impossible. The binding locations correspond to figure 1.

The sequences in patent claim 3 were also assessed using mapping experiments. However, neither antibodies or rbPrP were utilized as the visible substance but rather the color Congo red, whose specific binding for PrPSc has long been known (Prusiner et al. Cell 35, 349-358; 1983). Figure 3 shows the corresponding peptide bank with the colored binding location from which the sequences e-i were assessed, as mentioned above.

In figures 1-3 it can be seen that the sequences a-d or, as the case may be, e-i are not linearly connected sequences from PrP. On a three dimensional model of a C-terminal fragment of recombinant mouse PrP it could be shown that two sequences a-d as described in patent claim 2 were located closely together. It is very possible that the two other sequences take a new position during the conformation change in such a manner that all four sequences a-d in the PrPSc are located next to each other and very likely shaped in a conformational epitop.

The claimed sequences then, show sequence areas which can each be recognized in a peptide bank by for example PrPSc specific antibodies and which then with greater likelihood will, either alone or in combination, form a surface binding area in the native PrPSc protein, for example, and epitop. An epitop here means the specific antigen location on the surface of the PrPSc protein, which for example, is bound through the idiootype of 15B3.

In accordance with the invention, synthetic polypeptides are made available containing at least one of the sequences of the mentioned PrPSc binding substances recognized in the peptide bank (as well as possibly additional ones).

Synthetic polypeptides which have an antigen area of PrPSc are already mentioned in the WO 93/11153. The sequences mentioned there have rather extensive sections of the PrP sequence. The exact location of a sequence which, for example, form an epitop or partake in one is not shown, which makes impossible or difficult the reconstruction of the area of minimal synthetic polypeptides with, for example, the immunogenic effect of PrPSc.

As mentioned above, the synthetic polypeptide could minimally consist of merely one sequence as listed in patent claim 2 or other sequences. However, it is also possible to bind them to other suitable sequences listed in the following conformation sequences.

Theoretically, it could, for example, be possible to bind together, for example, the sequences via these conformation sequences and possibly other sequences in such a manner that the location of sequences in the PrPSc is simulated. Ideally, a protein with a surface (epitop) could be achieved in which several neighboring binding locations are contained as in the PrPSc.

In accordance with the invention, a design has been invented that will connect the claimed sequence (sequence b) with a conformation sequence in such a manner that a synthetic polypeptide with sufficient immunogenic binding power, for example 15B3, is created as experiments by the inventor show.

A polypeptide in this form can show one of the two below listed sequences:

- J) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R13)-Z-Tyr-Tyr-R3-Pro-R4-Asp-R5-Tyr-R6-(Asn-Gln)-(Y)
- K) (X)-Tyr-Tyr-R3-Pro-R4-Asp-R5-Tyr-R6-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R13)-(Y)

where X and Y are any amino acid sequences, Z is a common spacer for example Gly-Gly, R3 = Arg or Lys, R5 = Gln, Glu or Arg, R6 = Ser or Asn and R13 = Met or Val and the sequence areas listed in parenthesis are not necessarily present.

In its C-terminal area the sequence j contains the sequence b, which via, for example, the spacer Gly-Gly is bound to a conformation sequence which is connected to the N-terminal. The sequence in sequence k is exactly opposite. Other suitable spacers are generally all such sequences that have sufficient flexibility between the bound peptide areas and which have no influence on the conformation.

Both preferable inserted synthetic polypeptides were designed based on the knowledge that in PrPSc, reinforced β -pleat sheets occur whereby a conformation sequence is produced usually either sequence upward or downward, which induces an β -pleat sheet. The synthetic polypeptide in accordance with patent claim 6 were therefore fitted with suitable conformation sequences in order to place the epitop sequence in a PrPSc specific β -pleat sheet.

As is already well known, amino acids are divided into different groups depending on their size and polarity and/or, as the case may be, charge. Amino acids grouped together are called homologue and are divided into the following 5 groups:

- 1) Small, aliphatic, non-polar or only minimally polar acids:
alanine, serine, threonine and, in limited amounts, glycine, proline
- 2) Polar, negatively charged acids and their amides
- 3) Polar, positively charged acids
- 4) Large, aliphatic, non-polar acids:
methionine, leucine, isoleucine, valine, cysteine
- 6) Large, aromatic acids:
phenylalanine, tyrosine, tryptophane

In many cases, amino acids contained in peptide sequences could be replaced with acids from the same group without changing the characteristics of the sequence. Within the frame works of the invention fall sequences which do not explicitly correspond to the formulas but rather in which a switch of one or several amino acids for a homologue acid has taken place.

Furthermore, it can be assumed that amino acid sequences independently from their generating direction under certain circumstances could have similar binding capabilities, in particular, antibody binding capabilities. In that case it is retro-amino acid sequences and it then describes corresponding sequences, which are formed in C- or in N-terminal direction (for example [N-terminal]-Glu-Ala-Val-Leu-[C-terminal], [N-terminal]-Leu-Val-Ala-Glu-[C-terminal]). Should the used amino acids appear in the chiral D-reversed form instead of the L- form which occur

in animals the epitop area will be formed as a mirror image and will be recognized by its own antibodies whereby the characteristics of the isotopes of the antibodies differ. This is called inverseur amino acids sequences. Should both inverseur and retro amino acid be used, corresponding epitop areas develop which are bound unrestrictedly to the original sequence specific antibodies. The advantage of the use of, for example, retro-inverseur amino acid sequences lies in the fact that D-amino acids are broken down slower by the body since they are not easily recognized by the reducing enzymes. The same effect can also be achieved by using non-natural amino acids. The peptide according to the invention can also appear in retro- and/or in inverseur form and can contain non-natural (or non-organically produced) amino acids. Non-natural amino acids may be produced through the synthesis of, for example, additional side-chains or reactive groups with special characteristics and then adjusted to serve specific purposes.

As mentioned above, the synthetic polypeptide, according to the invention, is particularly useful in the treatment, prevention and also diagnosis of Prion diseases.

The synthetic polypeptide according to the invention is meant to, in particular, be used for immunization. For this purpose, a suitable amount of peptide is dissolved with Freund's complete adjuvant and is subcutaneously or intramuscularly injected. A booster of an immunogenic amount dissolved in Freund's incomplete adjuvant is administered weeks apart. The goal of the immunization is to provoke an immune reaction which causes endogenous production of antibodies which specifically

recognize the PrPSc and neutralizes it or, as the case may be, could mark it so the body's own immune defense mechanism can prevent a disease or can slow the development of the disease process or stop the disease process.

Another possibility would be to use the polypeptide in diagnosis and treatment. Conventional wisdom says that PrPSc and/or PrPC can bind among themselves. This assumption is supported by further mapping experiments of the inventor in which it was shown (as can also be seen in figure 2) that recombinant bovine rbPrP binds in similar sequence areas as do the above mentioned antibodies 15B3.

The mentioned binding characteristics could be useful in, for example, treatment. It would be possible to apply the polypeptides of the invention via the brain and there make it available as a binding partner for the infectious PrPSc. In this way the conversion rate could be drastically reduced and the development of the disease could be slowed down. For diagnosis purposes it would be possible to specifically bind the polypeptide of the invention with PrPSc contained in a sample material and then in a suitable manner detect it.

The synthetic polypeptide of the invention is not limited to the listed sequences. It is also possible to have peptide in derivative form. It could, for example, be interesting to bind such peptides with a carrier or, as the case may be an immunogen such as diphtheriatoxide or BSA for the reinforcement of the immune response. Another possible derivative would be the linking with marking identifiers such as biotin or peroxidase or with enzymes or nucleic acid. Finally, it would be possible to have signaling sequences, which facilitates the passage of the peptide to the desired compartment. Of interest here is especially the blood-brain-barrier whose passage can be facilitated through the use of signal sequences which, for example, bind to transfer-in receptors.

As has been mentioned several times above, the synthetic polypeptide according to the invention will be useful in the treatment, diagnosis and prophylaxis of Prion diseases. In connection with all mentioned utilization possibilities an important element of the invention is that the polypeptide according to the invention may be administered to a patient alone or in combination with other substances, whereby as explained above, derivative forms may be substituted to facilitate the passage into specific compartments.

The production of polypeptides can occur as desired, either directly via common peptide synthesis techniques or indirectly via RNA- or DNA-synthesis and then using conventional molecular biological techniques. Correspondingly, a further aspect of the invention is directed toward a DNA molecule which is capable of coding a polypeptide of the invention. Preferably such a DNA molecule (or a longer sequence) would be made available in a suitable expression vector. This is considered routine technique.

The invention also includes a kit for the diagnosis of PrPSc or of antibodies against PrPSc which contain at least one of the polypeptides of the invention. Here it is noteworthy that the polypeptide specifically is capable of binding itself to PrPSc and to the antibodies directed against it.

As already mentioned above, recombinant bovine rbPrP may be used as a binding substance introduced to detect the polypeptide sequence. Surprisingly recombinant rbPrP is capable of specifically bind to PrPSc and at the corresponding peptide bank is able to recognize the same sequences as the antibodies 15B3 (see figure 2).

A further aspect of the invention thus concerns the use of recombinant rbPrP protein corresponding to the sequence in figure 4. PrPSc specific antibodies are produced when recombinant rbPrP is administered with the indicated sequence. This effect can be particularly useful in the framework of the prophylaxis or treatment, as recombinant rbPrP is prepared as a vaccine and administered to a patient and a corresponding immune response is caused.

The design is naturally not limited to the use of bovine rbPrP according to figure 4. Recombinant PrP sequences with characteristic variations from the sequence shown in figure 4 can also be used.

Finally, the invention includes a process by which PrPSc specific antibodies are produced. For vaccination, non-human subjects are administered a dose suitable for immunization of at least one polypeptide of the invention and the antibodies which are produced in this process are isolated using the common methods.

Finally, the peptide of the invention are also usable in so-called pharmaceutical or chemical libraries where new agents are tested or identified which specifically bind to PrPSc.

SEQUENCE PROTOCOL

(1) GENERAL DETAILS:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: Prionics AG
- (B) STREET: Wintherturerstr. 190
- (C) CITY: Zurich
- (D) STATE: Zurich
- (E) COUNTRY: Switzerland
- (F) POSTAL CODE: CH-8090

- (A) NAME: Korch, Carsten
- (B) STREET: 1534 Cole Street
- (C) CITY: San Francisco
- (D) STATE: California
- (E) COUNTRY: USA
- (F) POSTAL CODE: CA 94117

- (A) NAME: Oesch, Bruno
- (B) STREET: Haldenstrasse 13
- (C) CITY: Stilli

- (E) COUNTRY: Switzerland
- (F) POSTAL CODE: CH-5233

- (A) NAME: Moser, Markus
- (B) STREET: Waidfussstrasse 25
- (C) CITY: Zurich
- (D) STATE: Zurich
- (E) COUNTRY: Switzerland
- (F) POSTAL CODE: CH-9037

(ii) DESCRIPTION OF THE INVENTION: Synthetic polypeptide for the diagnosis and treatment of Prion diseases

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 1

(iv) COMPUTER READING CAPACITY:

- (A) DATA CARRIER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) DETAILS PERTAINING TO SEQUENCE ID NUMBER: 1

- (i) SEQUENCE IDENTIFIER:
 - (A) LENGTH: 219 Amino acids
 - (B) TYPE: Amino acids
 - (C) STRAND TYPE: Single strand molecule
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGINAL ORIGIN
 - (A) ORGANISM: Bos taurus
- (viii) POSITION IN THE GENOME:
 - (C) UNIT: 219
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NUMBER: 1
(REFER TO *SEQUENZBESCREIBUNG: SEQ ID NO: 1*)

PATENT CLAIMS:

1. A synthetic polypeptide, which contains one or more defined sequences of PrP or which contains sequences derived therefrom, and which is recognized by PrPSc binding substances.
2. A synthetic polypeptide in accordance with patent claim 1 for which the sequence corresponds to one of the following formulas and which contains at least one of the mentioned sequences or a combination of several sequences:

- j) Gly-R1-Asp-R2-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- k) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R3-Pro-R4-Asp-R5-Tyr-R6-(Asn-Gln)
- l) Cys-R7-Thr-Gln-Tyr-R8-R9-Glu-Ser-R10-Ala-(R11-Tyr)
- m) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R12-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in which R1 = Asn or Ser, R2 = Trp or Tyr, R3 = Arg or Lys, R4 = Met, Val or Ala, R5 = Gln, Glu or Arg, R6 = Ser or Asn, R7 = Val, Thr or Ile, R8 = Gln or Glu, R9 = Lys, Arg or Gln, R10 = Gln or Glu, R11 = Tyr, Ser or Ala and R12 = His, Tyr or Asn and the amino acids listed in parenthesis are not necessarily present.

3. A synthetic polypeptide in accordance with patent claim 1, by which the sequence corresponds to one of the following sequences and which contains at least one of the mentioned sequences or a combination of several sequences:

- n) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- o) Lys-Pro-R14-Lys-Pro-Lys-Thr-R14-R15-Lys-His-R16-Ala-Gly
- p) Tyr-R16-Leu-Gly-Ser

- q) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R17-R17-His-Phe-Gly-R14-Asp
- r) Asn-Met-R18-Arg-Tyr-(Pro-R14)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R19)

in which R14 = Asn or Ser, R15 = Met, Leu or Phe, R16 = Met or Val, R17 = Ile, Leu or Met, R18 = His, Tyr or Asn and R19 = Lys or Arg and the amino acids or sequence areas listed in parenthesis are not necessarily present.

4. A synthetic polypeptide in accordance with one of the patent claims 1-3, characterized by the fact that the sequence could be fused via a common spacer sequence to a "conformation" sequence which induces the training of a defined conformation of the synthetic polypeptide.
5. A synthetic polypeptide in accordance with one of the patent claims 1-4, characterized by the fact that the "conformation" sequence induces the training of a β -strand.
6. A synthetic polypeptide in accordance with patent claims 2, 4 and 5 corresponding to one of the following formulas:
- e) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R13)-Z-Tyr-Tyr-R3-Pro-R4-Asp-R5-Tyr-R6-(Asn-Gln)-(Y)
- f) (X)-Tyr-Tyr-R3-Pro-R4-Asp-R5-Tyr-R6-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R13)-(Y)

whereby X and Y are any amino acid sequences, Z is a common spacer, for example Gly-Gly, R3 = Arg or Lys, R5 = Gln, Glu or Arg, R6 = Ser or Asn and R13 = Met or Val and the sequence areas listed in parenthesis do not necessarily have to be present.

7. A synthetic polypeptide in accordance with one of the above patent claims, characterized by the fact that it occurs in at least one part sequence in retro form.
8. A synthetic polypeptide in accordance with one of the above patent claims characterized by the fact that at least one of the contained amino acids occurs in D-form.
9. A synthetic polypeptide in accordance with one of the above patent claims, characterized by the fact that it occurs in a derivative form.
10. A pharmaceutical formulation for the therapy of Prion diseases, characterized by the fact that it contains at least one of the synthetic polypeptides mentioned in patent claims 1 - 9 or contains at least one of the defined sequences which recognize PrPSc binding substance in a dose large enough for the therapy or prevention.
11. An agent for the diagnosis of Prion diseases, characterized by the fact that it contains at least one of the synthetic polypeptides mentioned in patent claims 1-9 or contains at least one of the defined sequences which recognize PrPSc binding substance in a dose large enough for the appropriate evidence.
12. A substance for the purpose of vaccination for the prevention and therapy of Prion diseases with at least one of the polypeptides in accordance with patent claims 1 - 9 or at least one of the defined sequences which recognize PrPSc binding substance in a dose large enough for the immunization.
13. A pharmaceutical preparation, agent for the diagnosis or substance for the purpose of vaccination in accordance with one of patent claims 9 - 12, characterized by the fact that the contained PrPSc binding substance is recombinant generated mPrp using the formula from figure 4 or a similar variation.
14. A DNA molecule, which codes for at least the synthetic polypeptide in accordance with patent claims 1 to 9.

15. A kit for the detection of PrPSc or of antibodies characterized by the fact that it contains at least one synthetic polypeptide in accordance with patent claims 1 to 9.
16. A process for the production of specific antibodies characterized by the fact that non-human mammals are immunized with at least one polypeptide in accordance with patent claims 1 - 9 and that the antibodies built are isolated from the mammal after a suitable time period following immunization.
17. A process for the detection of PrPSc specific surface sequence area, characterized by the fact that one PrP specific peptide bank is incubated with PrPSc binding substances and the binding areas of the peptide bank are made visible using current visualization techniques and the sequence areas are thus assessed.
18. The use of polypeptide in accordance with patent claims 1 - 9 in a pharmaceutical or chemical library for the detection of PrPSc specific agents.